

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INTSTITUUT
PATOÜSIOLOOGIA OSAKOND

Kätlin Ahi

**Võimalikud seosed *IL22* geeni koopiaarvu variatsioonide ja vitiliigo kujunemise
vahel**

Bakalaureusetöö

Juhendajad MSc Ele Prans

PhD Olga Žilina

TARTU 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Vitiliigo	6
1.1.1 Vitiliigo kliinilised vormid.....	6
1.1.2 Vitiliigo seos teiste autoimmuunhaigustega	7
1.1.3 Vitiliigo patogenees	7
1.2 Interleukiin-22.....	8
1.2.1 Interleukiin-22 geeni ja valgu struktuur.....	8
1.2.3 IL-22 rakulised allikad	10
1.2.4 IL-22 bioloogiline roll.....	10
1.3 DNA koopiarvu variatsioonid	12
1.3.1 CNV-de tekkemehhanismid.....	13
1.3.2 CNV-de bioloogiline efekt.....	16
1.3.3 CNV-de uurimismeetodid	17
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	19
2.1 Töö eesmärgid.....	19
2.2 Materjal ja metoodika	19
2.2.1 Valim.....	19
2.2.2 Metoodika	20
2.2.3 Reaalaja kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon	21
2.2.4 Andmete statistiline analüüs	22
2.3 Tulemused.....	22
2.4 Arutelu	25
KOKKUVÕTE	27
RESÜMEE	28
TÄNUAVALDUSED.....	29
KASUTATUD KIRJANDUS.....	30
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	33
LISAD.....	34

SISSEJUHATUS

Vitiliigo on pigmentatsioonainevahetushaigus, mis väljendub melanotsüütide selektiivsest kahjustusest tingitud pigmendi kadu nahas, karvades ja limaskestades. Haiguse esinemissagedus on 1% elanikkonnast, kuid maailma erinevates populatsioonides võib sagedus kõikuda 0,1-st (Hiinas) kuni 8,8%-ni (mõndades India piirkondades) (Lu *et al.*, 2007; Behl ja Bathia 1972). Umbes 50%-l juhtudest avaldub haigus enne 20ndat eluaastat, 70-80%-l enne 30ndat eluaastat (Karelson 2013). Kuna vitiliigo haiguskolded paiknevad tihti nähtavatel aladel (näol ja kätel), vähendab haigus ka patsientide enesehinnangut ja elukvaliteeti (Alikhan *et al.*, 2011).

IL-22 (interleukiin-22) valk, mis kuulub IL-10 tsütokiinide perekonda, on rohkelt ekspresseeritud mitmetes kroonilistes põletikulistes haigustes, nagu psoriaas, atoopiline dermatiit ja reumatoid artriit (RA) (Zenewicz ja Flavell, 2011). Kuna vitiliigo kategoriseerub samuti kroonilise põletikulise haigusena ning lisaks on tõestatud, et *IL22* geenil on roll psoriaasi patogeneesis, võib oletada, et ka vitiliigol võib olla seos *IL22*-ga.

DNA koopiaarvu variatsioonid (*CNV – copy number variation*) on inimese genoomis geneetilise varieeruvuse allikaks ning nad ei oma tähtsust mitte üksnes geneetiliste haiguste tekkes, vaid ka geneetilise ja fenotüübilise muutlikkuse määramisel. CNV-de seost vitiliigoga on vähe uuritud ning tulemused limiteeritud.

Käesoleva töö eesmärgiks oli leida *IL22* geeni ekson 1 ja ekson 5 koopiaarvude variatsioonide võimalik osa vitiliigo tekkes. Selle jaoks uuriti Tartu Ülikooli Kliinikumi Nahahaiguste kliiniku vitiliigo patsientide DNA proove ning võrreldi neid tervete kontrollgrupi DNA proovidega.

Antud uurimustöö on jätk eelnevalt teostatud *IL10* perekonna geenide ühenukleotiidsete polümorfismide uuringule vitiliigo patsientidel Eesti populatsioonis, püüdes täiustada IL-10 perekonna tsütokiinide seost vitiliigo pärilikkuses.

Laboratoorne töö teostati TÜ Arstiteaduskonna bio- ja siirdemeditsiini instituudi patofüsioloogia laboris.

KASUTATUD LÜHENDID

AIH	autoimmuunhaigus
APS1	<i>autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1</i> , 1. tüüpi autoimmuunne polüendokrinopaatia sündroom
bp	<i>base pair</i> , aluspaar
BSA	<i>body surface area</i> , kehapinna haaratus
CCL3L1	<i>chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1</i> , kemokiini retseptori ligand
CGH	<i>comparative genomic hybridisation</i> , võrdlev genoomne hübridisatsioon
CI	<i>confidence interval</i> , usaldusintervall
CNP	<i>copy number polymorphism</i> , koopiaarvu polümorfism
CNV	<i>copy number variation</i> , koopiaarvu variatsioon
DEFB	<i>defensin, beta</i> , beeta defensiin
DSB	<i>double strand break</i> , kaheaahelalise DNA katkestus
EDC	<i>epidermal differentiation complex</i> , epidermaalne diferentseerumise kompleks
FoSTeS	<i>fork stalling and Template Switching</i> , rekombinatsioonikahvli peatumine ja matriitsi ümbervahetus
IFN	<i>interferon</i> , interferoon
IL	<i>interleukin</i> , interleukiin
kb	<i>kilobase</i> , tuhat aluspaari
LCE	<i>late cornified envelope</i>
LCR	<i>low-copy repeats</i> , madala koopiaarvuga kordusjärjestus
LPS	<i>lipopolysaccharide</i> , lipopolüsahhariid
Lti	<i>lymphoid tissue inducer</i> , naiivsed lümfoidrakud
MAPH	<i>multiplex amplifiable probe hybridization</i> , multipleks amplifitseeritavate proovide hübridisatsioon
MECP2	<i>methyl CpG binding protein 2</i>
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i> , multipleks ligeeritavate proovide amplifitseerimine
mRNA	<i>messenger RNA</i> , informatsiooni RNA

NAHR	<i>nonallelic homologous recombination</i> , mitte-alleelne homoloogiline rekombinatsioon
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i> , mittehomoloogne DNA otse liitmine
NK	<i>natural killer</i> , loomulik tapjarakk
nt	nukleotiid
OR	<i>odds ratio</i> , riskide suhe
p	<i>short arm of chromosome</i> , kromosoomi lühike õlg
PSORS4	<i>psoriasis susceptibility locus</i> , psoriaasi vastuvõtlikkuse lookus
q	<i>long arm of chromosome</i> , kromosoomi pikk õlg
RA	<i>rheumatoid arthritis</i> , reumatoid artriit
SLE	<i>systemic lupus erythematosus</i> , süsteemne erütematoosne luupus
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , ühenukleotiidne polümorfism
TGF	<i>transforming growth factor</i> , transformeeruv kasvufaktor
Th	<i>T helper cell</i> , T abistaja rakk
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> , tuumori nekroosi faktor
UTR	<i>untranslated region</i> , mittetransleeritav ala
VPREB1	<i>pre-B lymphocyte 1</i> , pre-B lümfotsüüt 1

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Vitiliigo

Vitiliigo on mittenakkuslik pigmentatsiooniainevahetushäire, mida iseloomustab melanotsüütide kahjustusest tingitud koldeline pigmendi kadu nahas, karvades ja limaskestades (Karelson *et al.*, 2006). Haigus võib ilmnedas igas vanuses ja esineb keskmiselt umbes 0,5-1% elanikkonnast. Haiguse esinemises ei ole olulisi soost ega rassist tingitud erinevusi (Alikhan *et al.*, 2011).

Vitiliigole iseloomulikke depigmenteerunud kumerate äärtega valgeid laike, mis esinevad enamasti näol, käe välispinnal, rinnanibudel, kaenlaalustes, nabaümbruses ja kubemepiirkonnas, ümbritseb normaalne nahk. Jäsemetel paikuvad haiguskolded tihti küünarnukkidel, põlvedel, sõrmedel, varvastel ja randmetel. Haiguskolded võivad sügeleda ning tihti esineb ka Köbneri efekt (lööbe teke trauma kohal) (Alikhan *et al.*, 2011) (lisa, joonis 17). Vitiliigo patsientidel võib esineda ka halo nevus, mille korral ümbritseb sünnimärki depigmenteerunud ala (Aouthmany *et al.*, 2012) (lisa, joonis 18). Esmakordselt võib haiguse ilmnemist näha päikesele nähtavatel aladel kevadel ja suvel. Haiguse vallandajateks võivad olla tugev päikesepeõletus, rasedus, nahavigastused ja stress (Dave *et al.*, 2002). Vitiliigo on enamasti aeglaselt progresseeruv haigus (Alikhan *et al.*, 2011; Torello ja Massimiliano 2013).

1.1.1 Vitiliigo kliinilised vormid

Tänaase päevani puudub ühene kliiniliste tüüpide klassifikatsioon. Kõige lihtsama klassifikatsiooni alusel jaotatakse vitiliigo mitte-segmentaalseks ja segmentaalseks vormiks, tuginedes erinevale jaotuvuse mustrile ning haiguse kliinilisele kulule (Karelson 2013).

Täpsema vitiliigo klassifikatsiooni alusel (olenevalt laikude jaotuvusest ja asukohast), jaotatakse vitiliigo kolmeks: lokaliseeritud, generaliseeritud ja universaalne (tabel 1) (Alikhan *et al.*, 2011; Torello ja Massimiliano 2013).

Tabel 1. Vitiliigo kliiniliste tüüpide ja alatüüpide klassifikatsioon (Hann *et al.*, 2000).

Vitiliigo tüüp	Alatüüp	Kirjeldus
Lokaliseeritud (lisa, joonis 14)	Segmentaalne	Üks või enam laiku ühel kehapoolel
	Koldeline	Üks või enam laiku ühel kehapoolel, kuid ei kuulu segmentaalsesse jaotusesse
	Limaskestade vorm	Esineb ainult limaskestadel
Generaliseeritud (lisa, joonis 15)	Akrofatsiaalne	Jäsemetel ja näol
	Harilik	Laiali jaotunud hajuvad laigud (kõige levinum vorm, Eestis ligi 80% vitiliigo patsientidest)
	Segavorm	Akrofatsiaalse ja hariliku vormi segu
Universaalne (lisa, joonis 16)		Täielik või peaaegu täielik depigmentatsioon, mis hõlmab enam kui 80% nahapinnast

1.1.2 Vitiliigo seos teiste autoimmuunhaigustega

Esimene tähelepanek vitiliigost ja võimalikust seosest teiste haigustega tuli ilmsiks Thomas Addisoni uurimuses 1855. aastal, kus ta kirjeldas seost vitiliigo ja neerupealiste puudulikkuse vahel (Addisoni tõbi, hüpokortisolism). Sellest ajast peale on kirjeldatud mitmeid vitiliigoga seotud süsteemseid haigusi, mis on peamiselt autoimmuunse patogeneesiga. Umbes 10-15% vitiliigo patsientidest esineb lisaks veel mõni autoimmuunhaigus (AIH). Sagedasemateks kaasuvateks haigusteks on Addisoni tõbi, atoopiline dermatiit, autoimmuunne türeoidiit ja krooniline uritikaaria. Harvemini vitiliigoga kaasuvate haigustena on täheldatud astmat, mittemelanoomset nahavähki (Alikhan *et al.*, 2011; Torello ja Massimiliano., 2013). Generaliseeritud vitiliigo esineb ~23% juhtudest koos teiste autoimmuunsete haigustega, sagedamini on nendeks autoimmuunsed kilpnäärme haigused, pernitsioosne aneemia, süsteemne erütematoosne luupus, Addisoni tõbi (Grimes *et al.*, 2004). Vitiliigo võib olla ka 1. tüüpi autoimmuunse polüendokrinopaatia sündroomi (APS1) üheks väljenduseks (Eisenbarth *et al.*, 2004).

1.1.3 Vitiliigo patogenees

Kuigi vitiliigot on kirjeldatud juba ~3500 aastat tagasi, on veel tänapäevalgi haiguse etioloogia teadmata (Caixia *et al.* 1999; Honda *et al.* 1997). Melanotsüütide düsfunktsiooni ja degeneratsiooni põhjustavate patofüsioloogiliste mehhanismide kohta on esitatud mitmeid hüpoteese: autoimmuunsed, neurohumoraalsed, biokeemilised tegurid (oksüdatiivne stress, autotüstitoksilisus) ja melanotsüütide lühenenud eluea hüpotees. Kaasajal on esiplaanil autoimmuunsed mehhanismid (Alikhan *et al.*, 2011; Sandoval-Cruz *et al.*, 2011; Torello ja Massimiliano, 2013).

Vitiliigo autoimmuunse tekkehüpoteesi kohaselt algab haigus melanotsüütide vastu suunatud immuunsüsteemi rünnakust, mille tagajärjel häirub melanotsüütide metabolism ja rakud hävinevad (Ongenae *et al.*, 2003). Vitiliigo patsientide vereseerumist on leitud mitmeid autoantikehi, mis on suunatud melanotsüüdi spetsiifiliste valkude antikehade vastu (Sandoval-Cruz *et al.*, 2011). Haigete

vereseerumist on leitud ka kilpnäärme koe vastaseid (anti-TPO), neerupealise koore vastaseid (AAA), tuumavastaseid (ANA) ja mao parietaalrakkude vastaseid (PCA) antikehi (Karelson 2013). Lisaks on vitiliigo haigete nahas kõrgenenud T-rakkude aktiivsus ja makrofaagide hulk, eriti just haiguskollete servades (van den Wijngaard *et al.*, 2000). Haiguskolde servast on leitud ka melanotsüütide suhtes tsütotoksilisi CD8⁺ T-rakke (Sandoval-Cruz *et al.*, 2011). Kõige enam viitab vitiliigo autoimmuunsele patogeneesile tema seotus teiste autoimmuunhaigustega (näiteks süsteemne erütematoosne luupus, pernitsioosne aneemia) (Alikhan *et al.*, 2011; Spritz, 2006).

Vitiliigo esineb sageli perekonniti: 7.0% esimese astme sugulastel, 6.1% õdedel-vendadel, 23% monosügootsetel kaksikutel, mis viitab haiguse tugevale geneetilisele komponendile. Haigusele on iseloomulik polügeenne pärilikkuse muster (Alkhateeb *et al.*, 2003).

1.2 Interleukiin-22

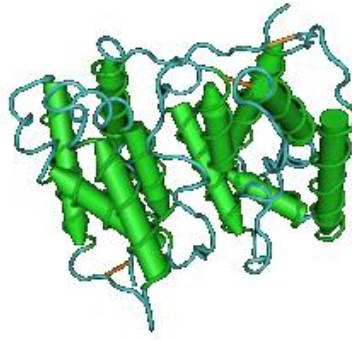
1.2.1 Interleukiin-22 geeni ja valgu struktuur

Interleukiin-22 (IL-22) on väike valk (joonis 1), mis avastati 2000. aastal ja mis kuulub IL-10 tsütokiinide perekonda, kuhu lisaks kuuluvad veel IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 ja IL-26. IL-10 perekonnaliikmetel on primaarjärjestuse identsus vaid 13-25%, kuid nad omavad sarnast geenistruktuuri ja sekundaarset valgustruktuuri ning kasutavad sama retseptorperekonna retseptoreid. Inimese IL-10 perekonna geenid lokaliseeruvad kahes genoomses regioonis: *IL22* ja *IL26* kromosoomregioonis 12q15 ning *IL10*, *IL19*, *IL20* ja *IL24* kromosoomregioonis 1q32 (Witte *et al.*, 2010).

Kõigil on sarnane intron-ekson struktuur: viie (*IL10*, *IL19*, *IL20*, *IL22*, *IL26*) või kuue (*IL24*) valgu kodeeriva eksoniga. Kodeeritavad valgud on 138-195 aminohappe pikkusega, IL-22 on 146-aminohappeline (Witte *et al.*, 2010).

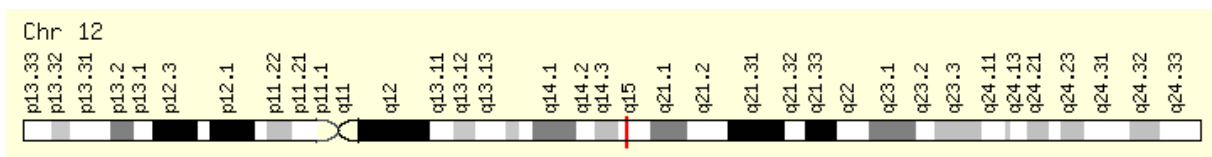
IL-22 retseptor koosneb IL-22R1 ja IL-10R2-st. IL-10 perekonna liikmed jagavad enamasti ühte retseptorahelat või isegi tervet retseptorkompleksi ning ka mõlemad IL-22 retseptorkomponendid on kasutatavad teiste interleukiinide poolt. Näiteks IL-22R1 on IL-20 ja IL-24 retseptorkomplekside subühik ning IL-10R2 kuulub IL-10 ja IL-26 retseptorkompleksi koostisesse (Fujita 2013; Witte *et al.*, 2010; Yang ja Zheng 2014).

Kuigi IL-10 perekonna interleukiinid on omavahel üsna sarnased, erinevad kõik liikmed teineteisest bioloogilise rolli poolest (Witte *et al.*, 2010).

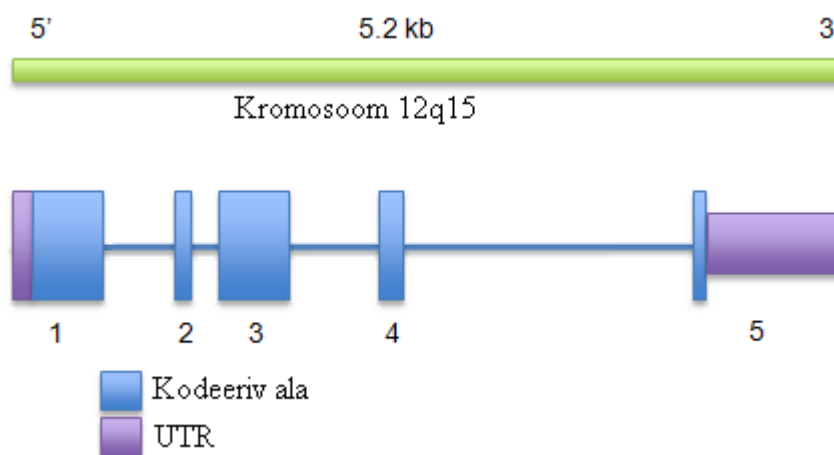


Joonis 1. IL-22 valgu kristallstruktuur¹

IL22 geen (5366 bp) asub 12q15 kromosoomi piirkonnas (joonis 2, 3) (koordinaadid vastavalt inimese genoomi versioonile GRCh37 68,642,022-68,647,387), koosneb viiest eksonist ja kodeerib IL-22 valku. Ekson 1 on 53-aluspaarine (*base pair*, bp), mille esimene pool kodeerib 5' mittetransleeritavat ala ja teine pool on valku kodeeriv, eksonid 2-4 (66, 144 ja 66 bp) ning ekson 5 esimene pool sisaldavad valku kodeerivat ala ning stopp-koodonit. Ülejäänud osa ekson 5-st (554 bp) kodeerib 3' mittetransleeritavat ala (Yang ja Zheng 2014).



Joonis 2. *IL22* geeni paiknemine kromosoomis²



Joonis 3. *IL22* geeni organisatsioon. *IL22* geeni (all) ja RNA (üleväl) struktuur. Numbrita 1-5 on tähistatud eksonid. Sinine värv tähistab eksoni kodeerivat ala ja lilla värv mittetransleeritavat ala (*untranslated region* – UTR)¹

¹ http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_IL22.html

² <http://www.genecards.org>

1.2.3 IL-22 rakulised allikad

Algselt arvati IL-22 olevat Th1-ga (*T helper 1* - T abistaja rakk 1) assotsieeruv tsütokiin, kuid uute T helperite avastamisega tuli välja, et peamisteks IL-22 tootjateks on Th17 ja Th22 (Fujita 2013; Zenewicz ja Flavell 2011; Witte *et al.*, 2010; Yang ja Zheng 2014). IL-22 ning IL-17 (Th17 peamine produkt) ei ekspresseerita alati koos ning on erinevalt reguleeritud. IL-17 ekspresseeritavate rakkude tootmiseks on vajalik TGF- β (*transforming growth factor β* - transformeeruv kasvufaktor) ja IL-6 juuresolek, kuid IL-22 ekspressioon ei ole antud tingimustes optimaalne, kuna TGF- β on IL-22 inhibiitor (Zenewicz ja Flavell 2011). Kuna Th22 rakud toodavad IL-22 ilma interferoon (IFN) γ , IL-4 ja IL-17 ekspresseerimiseta, on just see T-raku tüüp IL-22 toojana viimasel ajal enim tähelepanu pälvinud. Th22 leidub tervete isikute nahas ning külluslikult ka põletikuliste nahahaigustega patsientide nahas. Seetõttu võib oletada, et IL-22-l on oluline roll naha homöostaasis ning eriti just nahahaiguste patogeneesis (Fujita 2013).

Lisaks ekspresseerivad IL-22 veel NK (*natural killer* - loomulikud tapjarakud) ja LTi (*lymphoid tissue inducer* - Lti rakud) rakud (Witte *et al.*, 2010).

1.2.4 IL-22 bioloogiline roll

IL-22 tundub olevat mediaator, mida toodavad immuunrakud, kuid neid rakke ennast ei mõjutata. IL-22 pigem reguleerib teatud kudede rakke. Nagu eelnevalt mainitud, koosneb IL-22 retseptor IL-22R1 ja IL10R2 subühikutest, kuid ainult IL-22R1 ekspressioon määrab ära IL-22 sihtmärkrakud, milleks on mitte-hematopoeetilise päritoluga rakud. Immuunrakud ei ekspresseeri IL-22R1 (Witte *et al.*, 2010). IL-22R1 ekspresseeritakse mitte-hematopoeetilise päritoluga rakkudes, mida leidub neerudes, pankreases, maksas, nahas, seedekulglas ja kopsudes. Võrreldes põrna, luuüdi ja tüümusega, milles leidub palju immuunrakke, ei ekspresseerita seal IL-22R1 (Yang ja Zheng, 2014).

1.2.4.1 IL-22 efekt põletikulises epidermises

IL-22 ekspresseeritakse mitmetes kroonilistes põletikulistes haigustes nagu psoriaas, põletikuline soolehaigus ja reumatoid artriit. On veel ebaselge, kas IL-22 tõus on põletiku tekitaja ja/või selle põhjus. Katsed hiirtega on aidanud IL-22 rolli paremini mõista ning jõutud järeldusele, et IL-22 osaleb nii põletikulistes protsessides kui ka rakkude kaitses (Zenewicz ja Flavell 2011).

Kõige rohkem on uuritud IL-22 funktsiooni põletikulises nahas. On loodud transgeenseid hiiri ja kutsikaid, kelle nahas on IL-22 üleekspresseeritud. Hiirte nahal oli ebatüüpiline fenotüüp, mis meenutas psoriaasi ning kutsikatel esines läikiv ja jäik nahk ning need surid mõni päev pärast sündi. Naha histoloogilise analüüsiga oli näha paksenenud epidermist ning dermisesse olid infiltreerunud makrofaagid (Zenewicz ja Flavell 2011).

Nende erinevate uurimisgruppide tulemused on kooskõlas *in vitro* katsetega, kus leiti, et IL-22 mõjutab keratinotsüütide proliferatsiooni ja epiteelset hüperplaasiat. Näidatud on ka IL-22 rolli epidermise ülesehitamises (Wolk *et al.*, 2009). Seega, IL-22 indutseerib keratinotsüütide migratsiooni, mis viib keratinotsüüdi kihtide hüperplaasiani, mille tulemusena pakseneb epidermis (Zenewicz ja Flavell 2011).

IL-22 funktsiooniks on ka koe parandamine pärast vigastust. Pickerti ja kolleegide grupi uurimuses võrreldi IL-22-puudulike hiirte ja metsik-tüüp hiirte limaskestast paranemist pärast vigastust. Tulemuseks oli IL-22-puudulike hiirte aeglasem paranemine (Pickert *et al.*, 2009). Ka *in vitro* analüüside tulemustes on näha, et keratinotsüütide ravi IL-22-ga kiirendab paranemisprotsessi. Lisaks on näidatud, et IL-22 antimikroobsete peptiidide induktsioon keratinotsüütides inhibeerib haavas bakteriaalselt infektsiooni (Zenewicz ja Flavell 2011).

Põletikulistes haigustes ei tekita IL-22 ainult põletikku, vaid omab ka kaitsvat rolli. Sellel tsütokiinil on kaitsev *versus* põletikku tekitav funktsioon. On näidatud, et IL-22 kaitseb hepatiidi ajal maksarakke. Hepatotsüütides aktiveerib IL-22 ellujäämis- ja anti-apoptootilise raja, mis takistab rakkude hukkumist. See, kumb IL-22 funktsioon avaldub, oleneb üleüldisest tsütokiini miljööst ja sellest, millises koes on põletik (Zenewicz ja Flavell 2011).

1.2.4.2 IL-22 roll autoimmuunhaigustes

IL-22 ekspressioonitaseme tõus mitmetes kroonilistes põletikulistes haigustes on põhjustatud peamiselt IL-22 tootvate immuunrakkude (Th22, Th1 ja Th17) aktivatsioonist (Witte *et al.*, 2010).

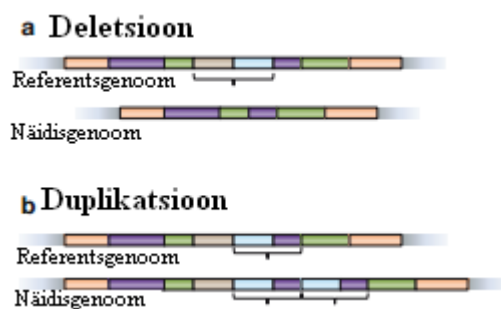
Eelnevalt on uuritud IL-22 rolli psoriaasi ja atoopilise dermatiidi patogeneesis ning on näidatud IL-22 kõrgeks ekspresseeritud patsientide naha haiguskolletes ja vereseerumis (Fujita 2013; Yang ja Zheng 2014). IL-22 rolli vitiliigo arengus on väga vähe uuritud. Vitiliigo kategoriseerub samuti kroonilise põletikulise haigusena ning umbes 10-15% (Alikhan *et al.*, 2011; Torello ja Massimiliano 2013) patsientidel areneb mõni muu autoimmuunhaigus, sh psoriaas või atoopiline dermatiit (Fujita 2013; Witte *et al.*, 2010; Yang and Zheng 2014), seega on põhjust uurida tsütokiini rolli ka vitiliigo patsientidel.

2008. aastal uuriti Tartu Ülikooli arstiteaduskonnas, füsioloogia instituudis IL-10 perekonna interleukiinide mõju vitiliigo patsientidel. Võrreldi IL-10 perekonna geeniekspressiooni taset nahas ja perifeerses mononukleaarses veres nii vitiliigo patsientide kui ka tervete, kroonilisi nahahaigusi mitte-põdevate, kontrollgrupi isikutel. Tulemusest selgus, et patsientide *IL19*, *IL20* ja *IL24* geeniekspressioonitasemes ei olnud märkimisväärset vahet, võrreldes tervete kontrollidega. Patsientide *IL24* geeniekspressiooni tase tõusis märgatavalt LPS (lipopülsahhariidi)

stimulatsiooniga, kuid see erinevus ei kajastunud peptiidide tasemel vereseerumis. Kõige märkimisväärses oli patsientide *IL22* 5,5-kordne ekspressioonitaseme tõus nahas ja 2,4-kordne valgukontsentratsiooni taseme tõus veres, võrreldes kontrollidega. Aktiivse vitiliigo vormiga patsientide mRNA ekspressioonitase nahas, võrreldes kontrollidega, oli 6,1 korda kõrgem ning mitteaktiivse vormiga vaid 1,3 korda kõrgem. Ka seerumi mRNA tase oli aktiivses faasis kõrgem. On üsna tõenäoline, et IL-22 rajad põhjustavad põletikku vitiliigo aktiivses faasis, kui toimub melanotsüütide hävimine (Rätsep *et al.*, 2008).

1.3 DNA koopiaarvu variatsioonid

DNA koopiaarvu variatsioon (*CNV - Copy Number Variation*) on genoomi struktuurse varieeruvuse vorm, mis kujutab endast 1 kb (*kilobase* - tuhat aluspaari) või suuremat DNA segmenti, mille koopiate arv genoomis on erinev, võrreldes referentsgenoomiga (Feuk *et al.*, 2006). CNV-de klassi kuuluvad deletsioonid, duplikatsioonid ja insertioonid (joonis 4). Keskmiselt hõlmavad CNV-d >1% genoomist (Pang *et al.*, 2010). CNV-d võivad hõlmata nii transkribeeritavaid (terved geenid või geenide osad, geenide kogumid) kui ka mitte-transkribeeritavaid segmente (k.a. reguleerivad elemendid) (Lee ja Scherer 2010; Stankiewicz ja Lupski 2010).



Joonis 4. Deletsioon ja duplikatsioon kromosoomis. Erinevad värvid kujutavad erinevaid DNA segmente. Joonisel on kujutatud deletsiooni (a), kus referentsgenoomist on deleteerunud hall ja helesinine fragment, ning dupliatsiooni (b), kus lilla ja helesinine segment on kahekordistunud (Lee ja Scherer 2010).

Muutused DNA koopiaarvus mängivad rolli geneetilises ja fenotüübilises varieeruvuses inimeste vahel ja inimese evolutsioonis. Lisaks võivad CNV-d kindlates genoomi piirkondades põhjustada geneetilisi haigusi või mõjutada vastuvõtlikkust komplekssete haiguste vastu, nagu autism ja skisofreenia. Peamised mehhanismid, mille kaudu CNV-d avaldavad mõju fenotüübile, on geeni doosi muutus tänu geeni enda koopiaarvu muutusele või reguleeriva elemendi häirimine (Stankiewicz ja Lupski 2010).

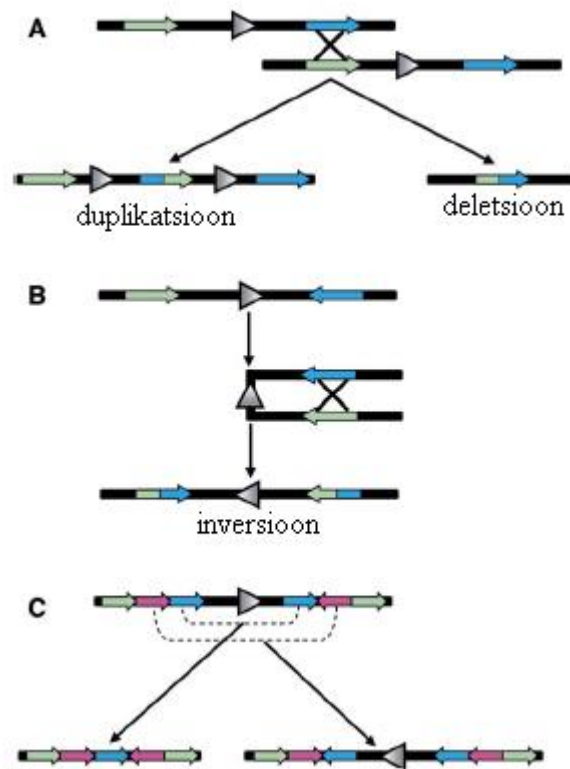
Kui konkreetse CNV sagedus üldpopulatsioonis on >1%, on tegemist polümorfismiga (CNP – *copy number polymorphism*) (Eichler 2008). CNP-d on enamasti väikesed (<10 kb) ning on tihti seotud geenidega, mille produktid on olulised immuunsuses ja ravimite detoksifikeerimises. On kirjeldatud CNP-de rolli psoriaasi (Hollox *et al.*, 2008) ja Chroni tõve (Fellermann *et al.*, 2006) tekkel.

1.3.1 CNV-de tekkemehhanismid

Genoomsed ümberkorraldused, sealhulgas CNV-d võivad olla nelja erineva päritoluga: (1) päritud vanemalt, kes on antud variandi kandja, (2) päritud vanemalt, kes on mosaiikne sama variandi suhtes, (3) *de novo* tekkinud vanema sugurakkudes või (4) *de novo* tekkinud somaatilistes rakkudes (Lee ja Scherer 2010).

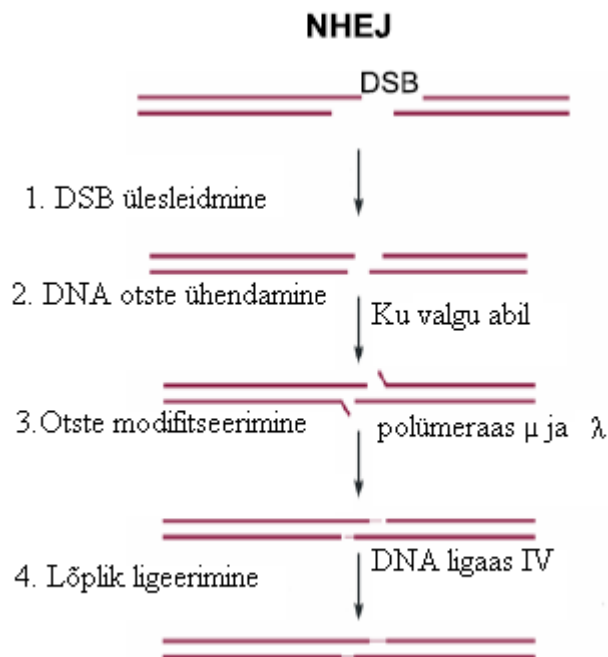
Tänapäeval on kirjeldatud kolm peamist mehhanismi CNV-de tekkimiseks: (1) mitte-alleelne homologiline rekombinatsioon, (2) mittehomoloogne DNA otste liitmine ning (3) rekombinatsioonikahvli peatumine ja matriitsi ümbervahetus (Gu *et al.*, 2008; Klopocki ja Mundlos 2011; Stankiewicz ja Lupski 2002).

Mitte-alleelne homologiline rekombinatsioon (NAHR - *nonallelic homologous recombination*) toimub kahe madala koopiarvuga kordusjärjestuse (LCR - *low-copy repeats*) vahel (Stankiewicz ja Lupski 2002; Stankiewicz ja Lupski 2010). LCR-id on 10 kuni 300 bp pikkused DNA järjestused, mis on kuni 97% ulatuses omavahel sarnased (Stankiewicz ja Lupski 2010). See, milline aberratsioon tekib, sõltub LCR-ide omavahelisest paigutamisest ja orientatsioonist. Näiteks, kui kaks LCR-i paiknevad samas kromosoomis ja samas suunas, põhjustab nendevaheline NAHR duplikatsiooni või deletsiooni. Kui paiknevad küll samas kromosoomis, aga vastassuunaliselt, toimub NAHR tulemusel fragmentide inversioon. Erinevas kromosoomis paiknevad LCR-id võivad põhjustada kompleksseid kromosomaalseid ümberkorraldusi (joonis 5) (Stankiewicz ja Lupski 2002).



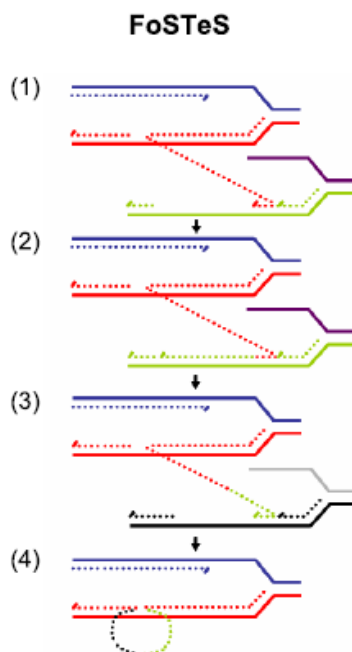
Joonis 5. Genoomsete ümberkorralduste teke NAHR/LCR mehhanismiga. Värvilised nooled tähistavad LCR-e, rekombinatsioon on tähistatud X-ga, suured hallid nooled tähistavad unikaalset DNA segmenti ja näitavad selle orientatsiooni. (A) NAHR tekitab deletsioone ja duplikatsioone, kui toimub samas orientatsioonis paiknevate LCR-de vahel; (B) NAHR tekitab inversioone, kui toimub vastassuunaliste LCR-de vahel; (C) Erinevate LCR-ide kombinatsioon põhjustab kompleksed ümberkorraldusi (Lee ja Lupski 2006).

Mittehomoloogne DNA otse liitmine (*NHEJ - non-homologous end joining*) toimub eukariootsetes rakkudes kaheaahelalise DNA katkestuste (*DSB - double-stranded DNA break*) parandamisel (Gu *et al.*, 2008). NHEJ toimub neljas etapis: (1) DSB ülesleidmine, (2) kahe murtud DNA ahela molekulaarne sidumine, (3) otste modifikatsioon, et muuta paremini ligeeritavaks ja (4) otste ligeerimine (joonis 6) (Gu *et al.*, 2008; Lieber *et al.*, 2003).



Joonis 6. Mittehomoloogne DNA otste liitmine (Gu *et al.*, 2008).

Rekombinatsioonikahvli peatumine ja matriitsi ümbervahetus (*FoSTeS* - *fork stalling and template switching*) on seotud DNA replikatsiooni käigus tekkinud vigadega (joonis 7). Selle mudeli põhjal vabaneb DNA replikatsioonikahvel algse ahela küljest ning liitub teise lähedal oleva ahelaga ja alustab uut sünteesi (Stankiewicz ja Lupski 2010). Lülitudes ümber kahvlile, mis asub allavoolu (*downstream*), põhjustab deletsiooni. Ülesvoolu (*upstream*) replikatsioonikahvlile lülitumine toob kaasa duplikatsiooni. FoSTeS võib toimuda mitmeid kordi, FoSTeS x 2, FoSTeS x 3 jne, mis näitab DNA polümeraasi nõrka protsessiivsust, põhjustades kompleksseid ümberkorraldusi (Gu *et al.*, 2008).



Joonis 7. Rekombinatsioonikahvli peatumine ja matriitsi ümbervahetus. (1) replikatsioonikahvel peatub ning seostub teise ahelaga (2) replikatsioon teiselt DNA ahelalt (3) replikatsioon jätkub kolmandal ahelal (4) replikatsioonikahvli tagasilülitumine esialgsele DNA ahelale (Gu *et al.*, 2008).

1.3.2 CNV-de bioloogiline efekt

Umbes 1,3% inimese genoomist katavad CNV-d ning põhjustavad rohkem inimestevahelisi DNA järjestuse varieeruvust kui ühenukleotiidsed polümorfismid (*SNP - single nucleotide polymorphism*) (Pang *et al.*, 2010). Seega on CNV-d inimeste geneetilise ning fenotüübilise varieeruvuse oluliseks allikaks. 2015. aasta mai seisuga on „*The Database of Genomic Variant*“ andmebaasi andmetel avaldatud koopiaarvu variatsioonide hulk inimese genoomis 353126³. Antud andmebaas sisaldab eelkõige tervetel inimestel leitud struktuurseid variatsioone, seega tõenäoliselt ei ole suurem osa neist haigustega seotud.

Samas sisaldades olulisi genee ja regulaatorelemente, võivad CNV-d mõjutada geeniekspressiooni ja seeläbi ka fenotüüpi. Seetõttu on põhjust arvata, et doositundlikke genee mõjutavatel CNV-del on märkimisväärne roll haiguste tekkimisel ja kulgemisel (Schaschl *et al.*, 2009). Huvitav on see, et duplikatsioonid ja deletsioonid samal doositundlikul geenil võivad anda erineva tulemuse. Näiteks deletsioon geenis *MECP2* (*methyl CpG binding protein 2*) on seotud Rett'i sündroomi kujunemisega. Kuid duplikatsioon samas geenis viib fragiilse X sündroomini (Klopocki ja Mundlos 2011). Mida suurem ja geenirikkam on CNV, seda tõenäolisemalt on see seotud mingi haigusega.

³ <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>

CNV-d võivad sisaldada gene, mis kodeerivad immuunsusega seotud molekule. Kui doositundlikud immuunsusega seotud geenid (või nende regulaatorelemendid) asuvad CNV-s, võib see viia mitmesuguste autoimmuunhaigusteni. On mitmeid tõendeid, et geneetilistel faktoritel on märkimisväärne osa autoimmuunhaiguste kujunemisel, kuid geneetilisi variatsioone on üsna vähe uuritud. Mitmed hiljutised uuringud on andnud tõendeid, et CNV-d inimese genoomis on seotud mõningate autoimmuunhaigustega (tabel 2) (Schaschl *et al.*, 2009). Näiteks ilmnes Holloxi ja kolleegide uurimustöös, et *DEFB* (*defencin beeta*) geeni (8p23.1) kõrgem koopiate arv tõstab psoriaasi haigestumise riski. Lisaks leiti ka, et see sama geenide klaster on seotud Chroni tõvega (Hollox *et al.*, 2008).

Tabel 2. CNV-dega seotud autoimmuunhaigused (Schaschl *et al.*, 2009)

Autoimmuunhaigus/sündroom	CNV-ga hõlmatud geenid	Lookus
SLE*	<i>C4A/C4B</i>	6q21
SLE	<i>CCL3L1</i>	17q12
Psoriaas	<i>DEFB</i>	8p23
Chroni tõbi	<i>DEFB</i>	8p23
Reumatoid artriit ja tüüp 1 diabeet	<i>CCL3L1</i>	17q12

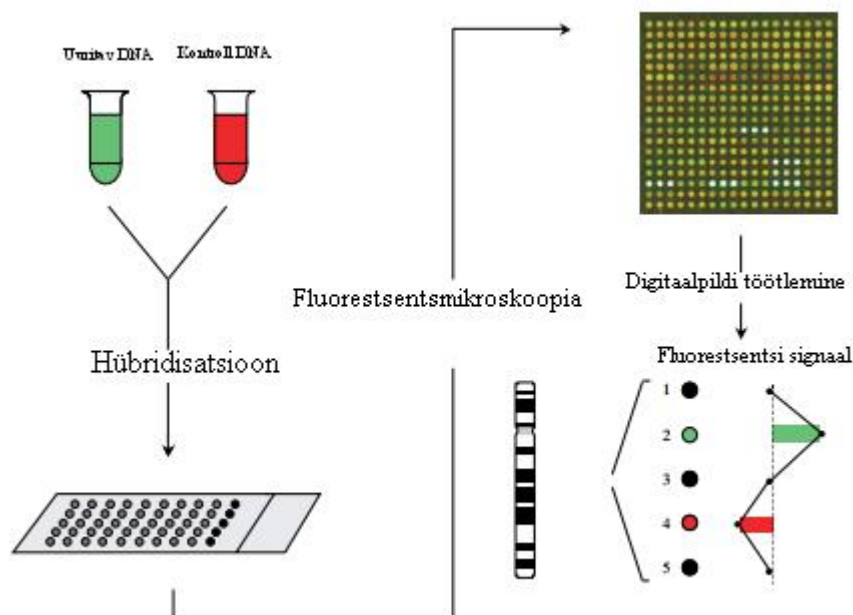
*SLE - süsteemne erütematoosne luupus

Samal ajal see, mida teame praegu CNV-de ja komplekssete geneetiliste haiguste seosest, on ainult jäämäe tipp. CNV-de poolt mõjutatud immuunsusega geenide välja selgitamine on oluline, et tulevikus mõista selgemini autoimmuunsuse molekulaargeneetikat (Schaschl *et al.*, 2009).

1.3.3 CNV-de uurimismeetodid

Genoomsete CNV-de tuvastamiseks on välja töötatud mitmeid meetodeid. Sõltuvalt töö eesmärgist rakendatakse kas ülegenoomseid või lookusspetsiifilisi meetodeid (Dear 2009; Cantsilieris *et al.*, 2012; Carter 2007).

Üks peamisi meetodeid CNV-de ülegenoomseks detekteerimiseks on DNA mikrokiibipõhised meetodid, k.a. kiibipõhine võrdlev genoomne hübridisatsioon (*array CGH – array-based comparative genomic hybridisation*) (joonis 8) ja SNP-põhised mikrokiibid. Iga mikrokiip koosneb tahkele kandjale (enamasti klaasile) kantud DNA fragmentidest, mis on 25 nt (nukleotiidi)-200 kb (aCGH) või 25-69 nt (SNP arrays) pikad. Mikrokiibipõhiste meetodite töö põhiprintsiibiks on hübridisatsioon kahe komplementaarse DNA ahela vahel: mikrokiibile kantud „proovide“ ja märgistatud uuritava „märklaua“ DNA vahel. Mikrokiibipõhiste meetodite peamisteks eelisteks on võime uurida ühe eksperimendi käigus suure hulga genoomipiirkondi, suur läbilaskevõime, kõrge tundlikkus ja spetsiifilisus (Dear 2009; Cantsilieris *et al.*, 2012).



Joonis 8. Mikrokiibipõhine võrdlev genoomne hübridisatsioon (aCGH). Uuritav genoomne DNA märgistatakse ühe fluorofooriga (nt. Cy3-ga) ja kontrollisikult pärinevat DNA-d teise fluorofooriga (nt. Cy5-ga). DNA-d segatakse kokku kordusjärjestusi blokeeriva DNA-ga. Saadud segu denatureeritakse ning hübridiseeritakse mikrokiibile. Fluorofooride fluorestsentssignaalide suhe mõõdetakse iga DNA fragmendi jaoks eraldi ja analüüsitakse. Punased signaalid viitavad deletsioonile uuritavas DNA-s; rohelised signaalid vastavad duplikatsioonile uuritavas DNA-s; kollased signaalid näitavad, et uuritav ja kontroll DNA esinevad võrdses koguses (Oostlander *et al.*, 2004).

Reaalaja kvantitatiivne PCR (*qPCR - real-time quantitative polymerase chain reaction*) on meetod uurimaks kindlat regiooni genoomis CNV-de esinemise suhtes. Reaktsiooni käigus märgistatakse PCR produkti fluorestseeruva värviga, milleks on kas kaheaahelalise DNA-ga seonduv värv (nt. SYBR® Green) või sondil tuginev meetodika nagu TaqMan®. Reaal-aja PCR masinad mõõdavad fluorententsignaali akumulereerimist reaktsiooni eksponentsiaalse faasi jooksul ning selle kaudu toimub PCR produkti hulga määramine. qPCR-i eelisteks on meetodi kiirus, kõrge tundlikkus, reaktsiooniks vajalik väike DNA hulk, ja võimalus jälgida reaajas amplitudide hulka (Dear 2009; Cantsilieris *et al.*, 2012).

CNV-de detekteerimiseks kasutatakse näiteks veel multipleks amplifitseeritavate proovide hübridisatsiooni (*MAPH - multiplex amplifiable probe hybridization*) (Armour *et al.*, 2000) ja multipleks ligeeritavate proovide amplifitseerimist (*MLPA - multiplex ligation-dependent probe amplification*) (Schouten *et al.*, 2002).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Vitiliigo ja DNA koopiaarvu variatsioonide vahelist seost on vähe uuritud. Antud uurimustöö eesmärgiks oli välja selgitada *IL22* geeni eksonite 1 ja 5 koopia arvu variatsioonide võimalikku seost vitiliigo tekkes.

Käesoleva töö autor teostas iseseisavalt vitiliigo patsientide CNV-de analüüsi ning koostas tulemuste tabelid. Varasemalt oli eraldatud genoomne DNA ning teostatud kontrollgruppi kuuluvate isikute CNV-de analüüs.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Valim

Antud uuring viidi läbi kooskõlas TÜ Inimuuringute Eetikakomisjoniga. Kõik uuringus osalenud isikud andsid kirjaliku nõusoleku uuringus osalemiseks peale kirjalikku ja suulist teavitamist selle eesmärkidest ja meetoditest.

Uuringusse kaasatud patsiendid ja kontrollisikud olid Eestis elavad Kaukasoidid. Vitiliigo patsientide vereproovid (n=152) koguti dr. Maire Karelsoni poolt TÜ Kliinikumi Nahahaiguste kliinikus. Kontrollgrupi (n=263) moodustasid terved vabatahtlikud arstiteaduskonna tudengid ja tervishoiu töötajad, kellel ei esinenud vitiliigot ega muid dermatoose ja nende vereproovid koguti dr. Külli Kingo poolt TÜ Kliinikumi Nahahaiguste kliinikus

Vitiliigo patsientide valimist 47 olid mehed ja 105 naised. Patsientide keskmine vanus oli 44,61 ($\pm 15,93$) aastat. Keskmine vanus haigestumisel oli 28,01 ($\pm 16,34$). Enam kui pooltel (58%) algas haigus enne 30. eluaastat. Keskmine haiguse kestvus uuritavatel patsientidel oli 16,75 ($\pm 13,5$) aastat. 138 patsiendi haiguse kulg oli aeglane, 11 patsiendil kiire ja 3 patsiendi haiguse kulgemise kiirust ei olnud võimalik hinnata (haigus on kas alles tekkinud või anamneesist ei ole selgunud, kas tegemist on aeglase või kiire haiguse progresseerumisega). Vitiliigo oli 106 patsiendil aktiivses faasis ja 46 patsiendil stabiilses faasis. Vitiliigo kliinilistest vormidest esines kõige enam harilik vorm (*v.vulgaris*) 127 patsiendil, 11 patsiendil akrofotsiaalne, 6 koldeline, 5 segmentaalne ja 3 patsiendil universaalne vorm. 39-l patsiendil esines vitiliigot ka perekonnas. Köbneri efekt esines 21 patsiendil, 25 patsiendil esines halo neevus ja 88 patsiendil kaasnesid vitiliigoga ka muud autoimmuunhaigused. 81 patsiendil oli BSA (*body surface area* - kehapinna haaratus) alla 10%, 52 patsiendil 11-50%, 16 patsiendil 51-90% ja 3 patsiendil üle 90% keha pinnast oli pigmendita. (tabel 3). Kontrollgrupi moodustasid 120 meest ja 143 naist, keskmine vanus oli 35,87 ($\pm 13,52$) aastat.

Tabel 3. Valimi kirjeldus.

	Vitiliigo patsiendid (n=152)	Kontrollid (n=263)
Sugu		
mees	47	120
naine	105	143
Keskmine vanus	44,61 ($\pm 15,93$)	35,87 ($\pm 13,52$)
Keskmine vanus haigestumisel	28,01 ($\pm 16,34$)	
Esinevus perekonnas		
jah	39	
ei	113	263
Keskmine haiguse kestvus	16,75 ($\pm 13,5$) aastat	
Haiguse kulg		
aeglane	138	
kiire	11	
Haiguse aktiivsus		
aktiivne	106	
stabiilne	46	
Kliiniline vorm		
harilik (<i>v. vulgaris</i>)	127	
akrofotsiaalne	11	
koldeline	6	
segmentaalne	5	
universaalne	3	

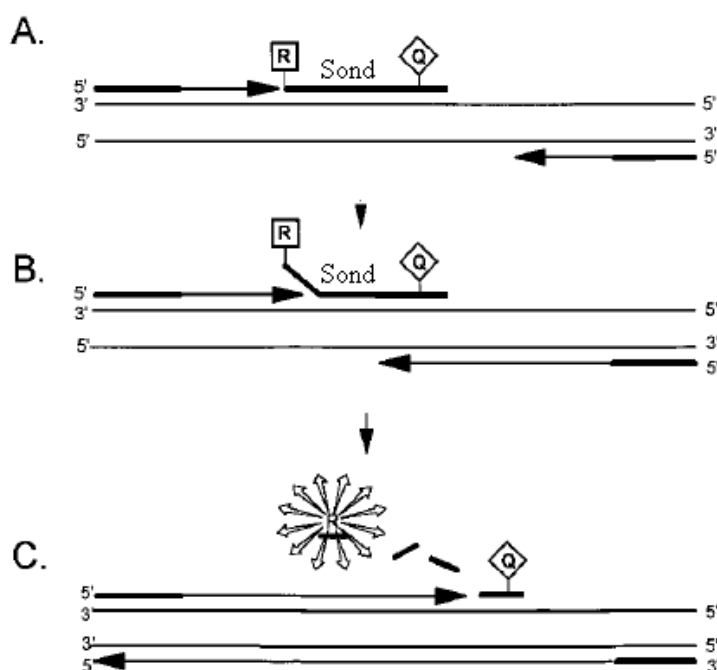
2.2.2 Metoodika

Genoomne DNA oli eelnevalt eraldatud ~6ml täisverest TÜ Füsioloogia Instituudis väljasoolamise meetodiga, mis põhineb raku valkude väljasoolamisel, dehüdreerides neid naatriumkloriidi lahusega. Eraldatud genoomse DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetrit. Proovide kontsentratsioon viidi 5 ng/ μ l-ni. DNA proovide lahjendamiseks kasutati TE (Tris-EDTA) puhvrit.

2.2.3 Reaalaja kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

IL22 geeni ekson 1 ja ekson 5 CNV-de analüüs viidi läbi kasutades reaalaja termotsüklerit ABI PRISM 7900HT Fast Real-time PCR Instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ning TaqMan kemikaale (ekson 1 Hs00146600_cn; ekson 5 Hs01988218_cn (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)). Tulemused intepreteeriti CopyCaller versioon 2.0 tarkvaraga (Life Technologies, Applied Biosystems, CA, USA).

TaqMan assay põhineb DNA polümeraasi 5' nukleaassel aktiivsusel. Selle meetodi puhul kasutatakse sondi ehk oligonukleotiidi, mille 5' otsa on seotud reportermärgis ja 3' otsa vaigistaja. Senikaua, kuni sond on terve, on märgiselt tulev signaal vaigistatud. Sond on disainitud nii, et jääks kahe praimerite vahele. Kui DNA polümeraasile ettejääv sond lagundatakse, siis reportermolekul vabaneb sondi 5' otsast ja annab fluorestsentssignaali (joonis 9) (Gibson 2005).



Joonis 9. TaqMan sondi tööpõhimõte. A. Reportmärgisega (R) ja vaigistava molekuliga (Q) sondi ja praimerite seondumine. B. Elongatsioon ja sondi väljatõrjumine. C. Sondi lagunemisel reportermolekul vabaneb ja annab fluorestsentssignaali. Ahela süntees viiakse lõpule (Morris *et al.*, 1996).

Kõik reaktsioonid viidi läbi neljas korduses 384 auguga MicroAmp Optical Reaction plaadil. Reaktsioonisegu lõppmahuga 10 µl sisaldas: 5 µl 2x TaqMan Genotyping MasterMix (Life Technologies Corporation, CA, USA), 0,5 µl TaqMan Copy Number Assay (detekteeris uuritavad sihtgeeni) 20x tööstokki, 0,5 µl 20x TaqMan Copy Number Reference Assay (detekteeris uuritava

järjestuse), 2 µl nukleasivaba vett ja 10 ng DNA-d. Reaktsioonid viidi läbi programmeeritavas termotsükleris tabelis 4 välja toodud programmi alusel.

Tabel 4. PCR programm

Faas	Temperatuur (°C)	Aeg
Hoidmine	95 °C	10 min
Tsüklid	95 °C	15 sek
(Kokku 40 tsüklit)	60 °C	60 sek

2.2.4 Andmete statistiline analüüs

Andmete analüüs teostati kasutades vabavara programmi R (<http://www.r-project.org>). Koopiaarvude ja kliiniliste parameetrite seose uurimiseks kasutati hii-ruut testi ja lineaarse regressiooni testi. Tulemuste erinevus loeti statistiliselt oluliseks p-väärtuse <0.05 korral.

2.3 Tulemused

Käesoleva bakalaaurusetöö raames määrati *IL22* geeni koopiate arvud eksonites üks ja viis 152-l vitiliigot põdeval patsiendil ning 263 tervel kontrollisikul.

Eksoni 1 koopiaarv varieerus vitiliigo patsientidel ühest kuueni (keskmine=2,05) ja kontrollindiviididel ühest neljani (keskmine=2,37). Erinevusi ei esinenud *IL22* geeni eksoni 1 CNVde jaotumisel patsientide ja kontrollide vahel ($p > 0,05$).

Eksoni 5 koopiaarv varieerus vitiliigo patsientidel ühest kuueni (keskmine=2,12) ja kontrollindiviididel ühest kolmeni (keskmine=2,03). Erinevusi ei esinenud *IL22* geeni eksoni 5 CNVde jaotumisel patsientide ja kontrollrühma isikute vahel ($p > 0,05$).

Lisaks võrdlesin vitiliigo patsientidel erinevate kliiniliste parameetrite ja *IL22* geeni CNV-de esinemist. Tabelites 5 ja 6 on näidatud erinevad tunnused ja nende CNV-de jaotumine. Patsiendid, kellel esines halo neevus, esines kõige enam koopiaarvu 2, mida esines kõige rohkem ka patsientidel, kellel halo neevust ei ilmnenu. Nii patsientidel, kellel kaasus ka vitiliigoga muid autoimmuunhaigusi (AIH), kui ka patsientidel, kellel peale vitiliigo muid autoimmuunhaigusi ei ilmnenu, esines kõige enam koopiaarvu 2. Koopiaarv 2 oli ka kõige enam esinev nii patsientidel, kellel esines Köbneri efekt, kui ka neil, kellel ei esinenud. Kehapinna haaratuse (BSA) kõigis erinevates gruppides oli prevaleerivaks samuti koopiate arv kaks. Analüüs erinevate kliiniliste parameetrite ja *IL22* geeni ekson 1 ja ekson 5 CNV-de vahel ei suutnud tõestada statistiliselt olulist seost (p -väärtused $> 0,05$).

Samuti võrdlesin patsientide CNV-de esinemist perekondliku ja sporaadilise vitiliigo haigusjuhtude vahel, kelle seas perekondliku vitiliigoga juhte oli 39, ülejäänud 113 patsiendi haigus oli sporaadiline. Perekondliku esinevuse ja *IL22* geeni CNV-de vahel ei suutnud tõestada statistilist seost (p-väärtus: ekson 1=0,6141, ekson 5=0,5166).

Statistiliselt oluline seos puudus meie uuringus ka *IL22* CNV-de ja patsientide vanuse vahel (ekson 1: $p=0,62$; ekson 5: $p=0,2229$).

Tabel 5. Vitiliigo kliinilised parameetrid ja nende *IL22* geeni ekson 1 CNV-de jaotumine.

Koopiate arv	Halo neevus		AIH		Köbneri efekt		BSA			
	esines(n=25)	ei esinenud(n=127)	esines(n=88)	ei esinenud(n=64)	esines(n=21)	ei esinenud(n=131)	< 10% (n=81)	11-50% (n=52)	51-90% (n=16)	>90% (n=3)
1	0	2	2	0	0	2	0	2	0	0
2	23	121	82	62	20	124	79	47	15	3
3	1	3	3	1	1	3	2	1	1	0
4	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
6	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0

Tabel 6. Vitiliigo kliinilised parameetrid ja nende *IL22* geeni ekson 5 CNV-de jaotumine.

Koopiate arv	Halo neevus		AIH		Köbneri efekt		BSA			
	esines(n=25)	ei esinenud(n=127)	esines(n=88)	ei esinenud(n=64)	esines(n=21)	ei esinenud(n=131)	< 10% (n=81)	11-50% (n=52)	51-90% (n=16)	>90% (n=3)
1	2	14	9	7	1	15	11	5	0	0
2	21	97	69	49	18	100	60	42	14	3
3	0	9	5	4	2	7	6	2	1	0
4	1	3	3	1	0	4	1	2	1	0
5	0	4	1	3	0	4	2	1	0	0
6	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0

2.4 Arutelu

Viimastel aastatel on järjest rohkem uuritud seoseid inimese DNA koopiaarvu variatsioonide ja erinevate haiguste vahel. CNV-d hõlmavad ligikaudu 1,3% inimese genoomist, moodustades olulise osa inimestevahelisest geneetilisest varieeruvusest. Erinevate uurimustööde põhjal on leitud, et CNV-del on roll näiteks psoriaasi, reumatoid artriidi ja süsteemse erütematoosse luupuse tekkes, muutes teatud haigusi põhjustavate geenide doosi (Prans *et al.*, 2013, Yim *et al.*, 2010, Yu *et al.*, 2011). Insertsioonide ja deletsioonide tulemusena muutub geenide koopiaarv või häiruvad reguleerivad elemendid, mistõttu muutub geeniekspressioon ning tulemusena võib tekkida geneetiline haigus.

Teadaolevalt ei ole avaldatud töid, mis käsitleksid seoseid *IL22* geeni koopiaarvude ja vitiliigo vahel. Avaldatud on aga mitmeid artikleid, kus on näidatud assotsiatsiooni CNV-de ja erinevate autoimmuunhaiguste kulgemise vahel. Näiteks, varasemalt on näidatud seost 22q11.2 regioonis paikneva *VPREB1* (pre-B lümfotsüüt 1) geeni CNV-de ja reumatoid artriidi vahel. Yim jt uurimustöö tulemustest selgus, et RA patsientidel esines madalam *VPREB1* geeni koopiaarv võrreldes kontrollidega. Uurimustööst järeldati, et *VPREB1* geeni madalam koopiaarv võib soodustada RA arengut (Yim *et al.*, 2010).

Variatsioone *IL22* geeni koopiaarvudes on varem uuritud süsteemse erütematoosse luupuse (SLE) puhul. Varasemalt on leitud seos *IL17F*, *IL21* ja *IL22* CNV-de ja SLE vahel, kus võrreldi patsientide ja kontrollide CNV-sid Th17-ga seotud geenides, kus näidati, et *IL17F*, *IL21* ja *IL22* kõrgem koopiaarv on seotud SLE vallandumisega (Yu *et al.*, 2011).

1q21 kromosoomis paiknevas epidermaalses diferentseerumise kompleksis (EDC – *epidermal differentiation complex*) asuvad mitmed geenid, mis on seotud keratinotsüütide diferentseerumisega (Williams *et al.*, 2002). Psoriaasi patsientidel on uuritud EDC-s paiknevaid PSORS4 (*psoriasis susceptibility locus* - psoriaasi vastuvõtlikkuse lookus) lookuse geene (näiteks *LOR*, *LCE1C*, *PGLYRP*, *SPRR*) (Hüffmeier *et al.*, 2010). CNV-de ülegenoomses uuringus leiti psoriaasi patsientidel, võrreldes kontrollidega, kõrgema sagedusega deletsioon *LCE* (*late cornified envelope*) lookuses *LCE3C* ja *LCE3B* geenides, mida seostatakse psoriaasi vallandumisega (de Cid *et al.*, 2009).

2013. aastal Tartu Ülikooli füsioloogia instituudis läbi viidud uuringus leiti seos *IL22* geeni kõrgema koopiaarvu ja psoriaasi vallandumise vahel (Prans *et al.*, 2013). Nii psoriaas, kui ka vitiliigo on kompleksse taustaga põletikulised nahahaigused ning tänaseni pole üheselt selge, miks mõnedel meist need haigused kujunevad. *IL10* perekonnas tsütokiinid on seotud epidermise funktsioonidega ning vitiliigo patsientide veres on tõusnud põletikuliste

tsütokiinide, sh. IL-22, ekspresioon (Rätsep, *et al.* 2008). Eelnevale leiule psoriaasi ja *IL22* geeni CNV-de vahel tuginedes, otsustasin uurida ka seost *IL22* ja vitiliigo vahel.

Antud uurimustöös otsisin seost *IL22* geeni ekson 1 ja ekson 5 CNV-de ja kliiniliste parameetrite ja perekondliku esinevuse vahel. Uuritud tunnustega statistiliselt olulisi tulemusi ma ei leinud. Antud töös ei suutnud näidata seost *IL22* geeni CNV-de ja vitiliigo kujunemise vahel.

Antud uurimustöö peamiseks puuduseks on väike valim, mistõttu on oluline katsesse kaasata suuremal arvul patsiente, et saada täiendavat kinnitust saadud tulemustele. Võib eeldada, et valimi suurendamine võib anda statistiliselt olulisi tulemusi vitiliigo kliiniliste tunnuste ja *IL22* CNV-de esinemise vahel. Antud töös ei ole uuritud *IL22* geeni regulaatorelementide võimalikke CNV-sid. Samas võib ka regulaatoralade del/dup häirida geenide ekspressiooni. Lisaks oleks oluline uurida ka teisi *IL10* perekonna geenide CNV-de ning ka SNP-de rolli vitiliigo kujunemises, et haigust paremini mõista ning ümber lükata või kinnitada antud leidu.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli anda kirjandusel põhinev ülevaade vitiliigost, *IL22* geenist, samuti DNA koopiarvu variatsioonidest, nende uurimiseks kasutatavatest meetoditest ja nende rollist inimese haiguste, k.a. autoimmuunhaiguste, tekkimisel. Eelnevalt on uuritud *IL-22* rolli psoriaasi ja atoopilise dermatiidi patogeneesis, kuid *IL-22* rolli vitiliigo arengus on väga vähe uuritud. Kuna vitiliigo kategoriseerub kroonilise põletikulise haigusena, nagu ka psoriaas ja atoopiline dermatiit, ning lisaks on tõestatud, et *IL22* geenil on roll psoriaasi patogeneesis, võib oletada, et ka vitiliigol võib olla seos *IL22*-ga.

Käesoleva töö eksperimentaalse eesmärgiks oli uurida *IL22* geeni CNV-sid ja selle seost vitiliigo kujunemisega. Selleks kaasati uurimusse Tartu Ülikooli Kliinikumi Nahahaiguste kliiniku vitiliigo patsiendid, keda oli valimis 152 ning võrreldi nende CNV-sid 263 kontrollisikuga. Patsientide ja kontrollide CNV-de analüüs viidi läbi reaalaaja PCR meetodil kasutades termotsüklerit ABI PRISM 7900HT Fast Real-time PCR Instrument ning TaqMan kemikaale. Tulemused analüüsiti CopyCaller versioon 2.0 tarkvaraga.

Eksperimentaalse töö tulemusena ei suudetud näidata seost *IL22* geeni CNV-de ja vitiliigo kujunemise vahel. Käesoleva uurimustöö piiravaks teguriks oli väike valim. Seega oleks oluline katsesse kaasata suuremal hulgal patsiente, et saada kinnitust või lükata ümber töö tulemusi.

RESÜMEE

Potential role of *IL22* copy number variation in pathogenesis of vitiligo

Kätlin Ahi

Vitiligo is an acquired skin disorder characterized by the loss of functional melanocytes from the epidermis which causes progressive, patchy loss of pigmentation in the skin. The prevalence is around 0,5-1% worldwide with no predilection for gender or race. In a study by Rätsep *et al.*, it has been demonstrated that increased expression level of *IL22* in PBMC (peripheral blood mononuclear cells) and higher IL-22 protein concentration in serum is associated with vitiligo.

DNA copy number variants are DNA segments of at least 1 kb that are duplicated or deleted in the genomes of organisms in comparison to the reference genome. CNVs have been associated with several diseases including autoimmune diseases such as Chron's disease, rheumatoid arthritis and psoriasis. Findings from the association between CNVs and vitiligo are limited and need to be further investigated.

The aim of this study was to find CNVs in *IL22* gene and relate the findings with the pathogenesis of vitiligo. 152 vitiligo patients and 263 controls participated in this study. *IL22* gene exon 1 and exon 5 copy number quantification was performed by qPCR method applying TaqMan chemistry and using ABI PRISM 7900HT Fast Real-time PCR Instrument and the CopyCaller 2.0 software package.

No associations were found between CNVs in *IL22* gene and vitiligo. Considering the small sample size, further research is required to confirm or disconfirm our findings.

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada Maire Karelsoni, kelle patsientide andmeid ja proove antud töös kasutati, nahahaiguste kliiniku juhatajat Külli Kingot ning oma juhendajaid Ele Pransi ja Olga Žilinat tänu kelle abile töö valmis.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Alikhan, A., Lesley M. Felsten, Daly M., and Rosic V.P. (2011) Vitiligo: A comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. Continuing Medical Education: 473-491
- Alkhateeb A., Fain P.R., Thody A., Bennett D.C., Spritz R.A. (2003) Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. Pigment Cell Res. 2003; 16: 208-14
- Armour J.A., Sismani C., Patsalis P.C., Cross G. (2000) Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. Nucleic Acids Res. 28: 605–609.
- Aouthmany M., Weinstein M., Zirwas M.J., Brodell R.T. (2012) The natural history of halo nevi: a retrospective case series. J Am Acad Dermatol. 2012 Oct;67(4):582-6.
- Behl P.N., Bhatia R.K. (1972) 400 cases of vitiligo. A clinico-therapeutic analysis. Indian J Dermatol. 17: 51-6
- Caixia T., Hongwen F., Xiran L. (1999) Levels of soluble interleukin-2 receptor in the sera and skin tissue fluids of patients with vitiligo. Am J Hum Genet.: 72:1560-15644
- Cantsilieris S., Baird P.N., White S.J. (2012) Molecular methods for genotyping complex copy number polymorphisms. Genomics. 2012 Oct 30. pii: S0888-7543(12)00206-6
- Carter N.P. (2007) Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. Nature Genetics: volume 39: S16-S21
- de Cid R., Riveira-Munoz E., Zeeuwen P.L.J.M., Robarge J., Liao W., Dannhauser E.N., Giardina E., Stuart P.E., Nair R., *et al* (2009) Deletion of the late cornified envelope (LCE) 3B and 3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. Nat Genet.; 41: 211–215.
- Dave S., Thappa D.M., Souza D.M. (2002) Clinical predictors of outcome in vitiligo. Indian J Dermatol Venereol Leprol 68: 323–325.
- Dear P.H. (2009) Copy-number variation: the end of the human genome? Trends Biotechnol. 27(8):448-54
- Eichler E.E. (2008) Copy Number Variation and Human Disease. Nature Education 1 (3) :1
- Eisenbarth G.S., Gottlieb P.A. (2004) Autoimmune polyendocrine syndromes. N Engl J Med. 350:2068–79

- Fellermann K., Stange D.E., Schaeffeler E., Schmalzl H., Wehkamp J., Bevins C.L., Reinisch W., Teml A., Schwab M., Lichter P., Radlwimmer B., Stange E.F. (2006) A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human Beta-defensin 2 gene copy number predisposes to crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 79, 439-448
- Feuk L., Carson A.R., Scherer S.W. (2006) Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 7: 85-97
- Fujita, H. (2013) The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *Journal of Dermatological Science:* 72: 3-8
- Gibson N.J. (2005) The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clinica Chimica Acta* 363: 32-47
- Grimes P.E., Morris R., Avaniss-Aghajani E. *et al.* (2004) Topical tacrolimus therapy for vitiligo: therapeutic responses and skin messenger RNA expression of proinflammatory cytokines. *J Am Acad Dermatol:* 51:52–61
- Gu W., Zhang F., Lupski J.R. (2008) Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetic:* 1: 4
- Hann S.K., Nordlund J.J. (2000) Clinical features of generalized vitiligo. Oxford: Blackwell Science: 35-48.
- Hollox E.J., Huffmeier U., Zeeuwen P.L., Palla R., Lascorz J., Rodijk-Olthuis D., van de Kerkhof P.C., Traupe H., de Jongh G., den Heijer M., Reis A., Armour J.A., Schalkwijk J. (2008) Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat Genet.* 40: 23-5
- Honda Y., Okubo Y., Koga M. (1997) Relationship between levels of soluble interleukin-2 receptors and the types and activity of vitiligo. *J Dermatol.:* 24:561-5633
- Hüffmeier U., Bergboer J.G., Becker T., Armour J.A., Traupe H., Estivill X., Riveira-Munoz E., Mössner R., Reich K., Kurrat W., Wienker T.F., Schalkwijk J., Zeeuwen P.L., Reis A. (2010) Replication of LCE3C-LCE3B CNV as a risk factor for psoriasis and analysis of interaction with other genetic risk factors. *J Invest Dermatol.* 130: 9799-84
- Karelson M. (2013) Vitiligo: clinical aspects, quality of life and the role of melanocortin system in pathogenesis.
- Karelson M., Kingo K., Silm H. (2006) Vitiliigo – mis on teada tänasel päeval? *Eesti Arst;* 85 (7): 438–444
- Klopocki E., Mundlos S., (2011) Copy-number variations, noncoding sequences, and human phenotypes. *Annu. Rev. Genom. Human Genet.* 12: 53-72
- Lee C., Scherer S.W. (2010) The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med:* 12: e8
- Lee J.A., Lupski J.R. (2006) Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron.* 5;52: 103-21.

- Lieber M.R., Ma Y., Pannicke U., Schwarz K. (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 712-20
- Lu T., Gao T., Wang A., Jin Y., Li Q., Li C. (2007) Vitiligo prevalence study in Shaanxi Province, China. *Int J Dermatol.* ;46: 47-51
- Morris T., Robertson B., Gallagher M. (1996) Rapid Reverse Transcription-PCR Detection of Hepatitis C Virus RNA in Serum by Using the TaqMan Fluorogenic Detection System. *Journal of Clinical Microbiology* p. 2933–2936
- Oostlander A.E., Meijer G.A., Ylstra B. (2004) Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet.* 66: 488-95
- Ongenae K., Van Geel N., Naeyaert J.M. (2003) Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Res.* 16: 90-100
- Pang A.W., MacDonald J.R., Pinto D., Wei J., Rafiq M.A., Conrad D.F., Park H., Hurles M.E., Lee C., Venter J.C., Kirkness E.F., Levy S., Feuk L., Scherer S.W. (2010) Towards a comprehensive structural variation map of an individual human genome. *Genome Biol.* 11: R52
- Pickert G., Neufert C., Leppkes M. et al. (2009) STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* 206:1465
- Prans E., Kingo K., Traks T., Silm H., Vasar E., Kõks S. (2013) Copy number variations in IL22 gene are associated with Psoriasis vulgaris. *Hum Immunol.* 74: 792-795
- Rätsep R., Kingo K., Karelson M., Reimann E., Raud K., Silm H., Vasar E., Kõks S. (2008) Gene expression study of IL10 family genes in vitiligo skin biopsies, peripheral blood mononuclear cells and sera. *British Journal of Dermatology*: 1275-1281
- Sandoval-Cruz M., García-Carrasco M., Sánchez-Porras R., Mendoza-Pinto C., Jiménez-Hernández M., Munguía-Realpozo P., Ruiz-Argüelles A. (2011) Immunopathogenesis of vitiligo. *Autoimmunity Reviews*: 10: 762–765
- Schaschl H., Aitman T.J., Vyse T.J. (2009) Copy number variation in the human genome and its implication in autoimmunity. *Clin Exp Immunol.* 156: 12-6
- Schouten P. J., McElgunn C. J., Waaijer R., Zwiijnenburg D., Diepvens F., Pals G. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 30: e57.
- Spritz, R. A. (2006) The genetics of generalized vitiligo and associated autoimmune diseases. *Journal of Dermatological Science*: 41: 3-10
- Stankiewicz P., Lupski J.R. (2002) Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet.* 2: 74-82
- Stankiewicz P., Lupski J.R. (2010) Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu. Rev. Med.* 61: 437-455

Zenewicz, L.A. and Flavell, R.A. (2011) Recent advances in IL-22 biology. *International Immunology*, Vol. 23, No. 3, pp. 159–163

Torello, L., D’Erme Angelo Massimiliano (2013) Vitiligo as a systemic disease, *Clinics in Dermatology*

van den Wijngaard R., Wankowicz-Kalinska A., Le Poole C., Tigges B., Westerhof W., Das P. (2000) Local immune response in skin of generalized vitiligo patients. Destruction of melanocytes is associated with the prominent presence of CLA⁺ T cells at the perilesional site. *Lab Invest.*;80: 1299-309

Williams R.R., Broad S., Sheer D., Ragoussis J. (2002) Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei. *Exp Cell Res.* 15; 272: 163-175.

Witte, E., Witte K., Warszawska K., Sabat R., Wolk K. (2010) Interleukin-22: A cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine & Growth Factor Reviews*: 21: 365-379

Wolk K., Haugen H. S. Xu, W. et al. (2009) IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J. Mol. Med*: 87:523

Yang X., Zheng S. G. (2014) Interleukin-22: A likely target for treatment of autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*: 13: 615–620

Yim S.H., Chung Y.J., Jin E.H., Shim S.C., Kim J.Y., Kim Y.S., Hu H.J., Shin S.H., Pae H.O., Zouali M., Chung H.T. (2010) The potential role of VPREB1 gene copy number variation in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Mol Immunol.* 48: 1338-1343

Yu B., Guan M., Peng Y., Shao Y., Zhang C., Yue X., Zhang J., Yang H., Zou H., Ye W., Wan J., Zhang W. (2011) Copy number variations of interleukin-17F, interleukin-21, and interleukin-22 are associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 63: 3487-9

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

¹ http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_IL22.html

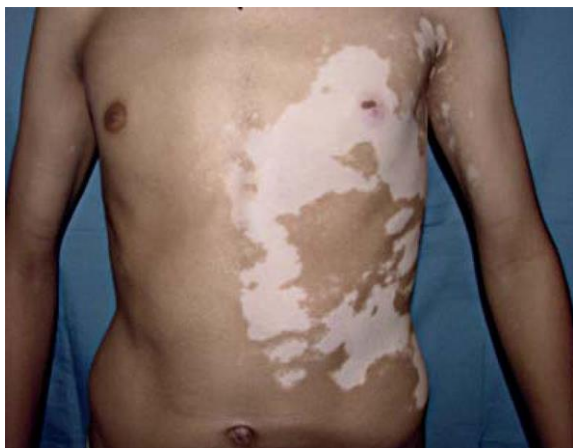
² <http://www.genecards.org>

³ <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>

⁴ <http://www.scielo.br/img/revistas/abd/v89n5//0365-0596-abd-89-05-0784-gf02.jpg>

⁵ http://www.culturamix.com/wp-content/gallery/como-ocorre_1/como-ocorre-2.jpg

LISAD

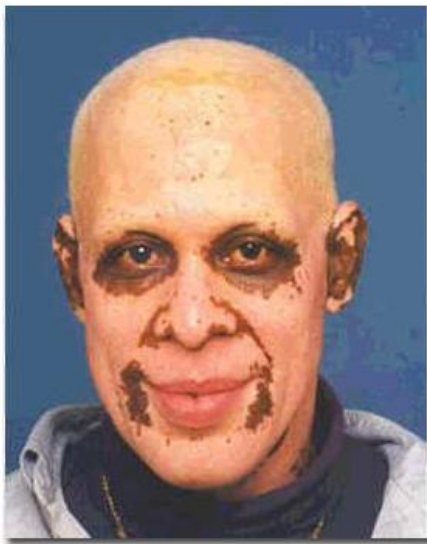


Joonis 14. Lokaliseeritud vitiliigo patsiendi ühel kehapoolel. ⁴



Joonis 15. Generaliseeritud vitiliigoga patsient. (Spritz, 2006)

⁴ <http://www.scielo.br/img/revistas/abd/v89n5//0365-0596-abd-89-05-0784-gf02.jpg>



Joonis 16. Universaalse vitiliigoga patsient. ⁵



Joonis 17. Köbneri efekt (*Alikhan et al.*, 2011)



Joonis 18. Halo nevus (*Aouthmany et al.*, 2012)

⁵ http://www.culturamix.com/wp-content/gallery/como-ocorre_1/como-ocorre-2.jpg

Lihtlitsents

Mina, Kätlin Ahi

(sünnikuupäev: 23.03.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Võimalikud seosed IL22 geeni koopiarvu variatsioonide ja vitiliigo kujunemise vahel,
mille juhendajad on Ele Prans ja Olga Žilina,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **25.05.2015** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015